

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07061999 A**

(43) Date of publication of application: **07 . 03 . 95**

(51) Int. Cl. **C07K 9/00**
C07K 1/107
// A61K 38/00
A61K 38/44

(21) Application number: **05227815**

(22) Date of filing: **23 . 08 . 93**

(71) Applicant: **SEIKAGAKU KOGYO CO LTD**

(72) Inventor: **SAKURAI KATSUKIYO**

(54) **PRODUCTION OF SACCHARIDE-MODIFIED PROTEIN**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a saccharide-modified protein raised in liver accumulateness and physiological activity by saccharide modification of a saccharide-modified protein, esp. a physiologically active protein using a simple, universal chemical method.

CONSTITUTION: The objective method for producing a saccharide-modified protein is characterized by reacting lactose-lactone with a protein in an aqueous medium at 0-45°C, and the objective saccharide-modified protein is characterized by being a bound reaction product from lactose-lactone and a protein (except interferon- α).

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-61999

(43) 公開日 平成7年(1995)3月7日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 9/00		8318-4H		
1/107		8318-4H		
// A 6 1 K 38/00				
			A 6 1 K 37/ 02	
			37/ 50	
			審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 5 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願平5-227815

(22) 出願日 平成5年(1993)8月23日

(71) 出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72) 発明者 桜井 勝清

東京都東大和市蔵敷2-527-6

(74) 代理人 弁理士 萩野 平 (外3名)

(54) 【発明の名称】 糖修飾蛋白質の製造法

(57) 【要約】

【目的】 簡便で汎用性のある化学的な方法によって糖修飾蛋白質を提供することであり、特に生理活性蛋白質を糖修飾することにより、肝臓集積性および生理活性を高めた糖修飾蛋白質を提供することである。

【構成】 ラクトースラクトンと蛋白質とを水性溶媒中、0～45℃で反応させることを特徴とする糖修飾蛋白質の製造法、およびラクトースラクトンと蛋白質（インターフェロン-αを除く）との結合反応生成物であることを特徴とする糖修飾蛋白質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトースラクトンと蛋白質とを水性溶媒中、0～45℃で反応させることを特徴とする請求項1記載の糖修飾蛋白質の製造法。

【請求項2】 ラクトースラクトンと蛋白質（インターフェロン-αを除く）との結合反応生成物であることを特徴とする糖修飾蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、人工的に合成される糖修飾蛋白質に関し、特に糖修飾生理活性蛋白質に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、生体由来の生理活性を有する蛋白質あるいは糖蛋白質を医薬あるいは診断薬として利用する試みがなされている。しかし、有効かつ特異的に利用するために、生体内での安定性を高めたり、代謝におけるシグナル作用、細胞内局所でのシグナル作用、レセプターや標的細胞に対する認識としてのシグナル作用を強めたり発現させたりすることが必須となってきた。その方法として、化学的に蛋白質を修飾することにより、該蛋白質の血中安定性を高めること、シグナル作用を高め、標的細胞あるいは標的臓器への取り込みを促進させること、蛋白質の生理活性を増大させること、さらには新たな生理活性を付与することなどが期待されている。

【0003】標的臓器としての肝臓への集積性に関連して、肝臓とガラクトースとの親和性が報告されている

(Kawasaki.T & Ashwell.G., J. Biol. Chem., 251, 129 6, 1976及びLee.Y.C. et al., J. Biol. Chem., 258, 199, 198 3)。この知見に基づいて肝癌、肝硬変、肝炎などの肝疾患に有効な生理活性を有する蛋白質に、末端にガラクトースを有する糖を結合させることにより、効率的に肝臓への蛋白質の取り込みを増大させ、治療効果を高めることができる。

【0004】例えば、β-D-ガラクトピラノシルポリエチレングリコールで修飾された生理活性蛋白質などが知られている（特開昭63-152393）。また、末端にガラクトース・ガラクトースの結合を有する糖鎖を多量に含む糖蛋白質を遺伝子操作で製造する技術も知られている（特開平1-102099）。しかし、従来の技術は複雑な製造工程、生理活性蛋白質を変性させる可能性のある反応条件等が必要であったり、特殊な真核細胞を用いて糖蛋白質として発現させる必要があり、十分満足な結果は得られていないし、実用化もされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、簡便で汎用性のある化学的な方法によって糖修飾蛋白質を提供することであり、特に生理活性蛋白質を糖修飾するこ

とにより、肝臓集積性および生理活性を高めた糖修飾蛋白質を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、以上の課題を解決するために鋭意検討した結果、以下の手段によって蛋白質にガラクトースが導入された糖修飾蛋白質を得ることができ、かつ糖修飾による生理活性蛋白質の活性の減少を防ぐことができ、得られた糖修飾蛋白質の肝臓集積性が極めて高いことを見出し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明はラクトースラクトンと蛋白質とを水性溶媒中、0～45℃で反応させることを特徴とする糖修飾蛋白質の製造法である。また、本発明はラクトースラクトンと蛋白質（インターフェロン-αを除く）との結合反応生成物であることを特徴とする糖修飾蛋白質である。以下本発明を詳細に説明する。

【0008】ラクトースラクトンは公知物質であり、以下の方法によって製造することができる。ラクトースを低級アルコール（例、メタノール）中、ヨウ素等の酸化剤で酸化し、還元末端のグルコピラノースを開環してラクタネート（lactanate）とし、次いで強酸性陽イオン交換樹脂（例、ダウエックス(Dowex) 50(H⁺)）等を用いて酸性条件とすることによって脱水閉環し、ラクトースラクトンを得ることができる(Polymer Journal, 17, (4), 567-575(1985))。

【0009】ラクトースラクトンと反応させる蛋白質は、特に制限なくラクトースラクトンと結合反応する官能基を少なくとも1個有していればよい。また、反応に用いる蛋白質の構造は、アミノ酸の他、糖鎖、その他の修飾基を有した蛋白質誘導体でもよい。本発明においては、反応に使用する蛋白質は、特に生理活性を有する蛋白質が有用である。

【0010】該官能基としては、ラクトースラクトンが開環して生じるガラクトース誘導体に存在するカルボキシル基と反応するものであれば特に制限はないが、一般的には第1級アミノ基等が例示できる。本発明の反応によってラクトースラクトンと該官能基が反応し、蛋白質分子中および/または蛋白質分子末端にガラクトース残基を有する糖修飾蛋白質を極めて効率よく製造することができる。

【0011】蛋白質の糖修飾率、即ち、ガラクトース残基結合率は、蛋白質に対するラクトースラクトンの使用量、反応時間等の反応条件によって変動するが、本発明の糖修飾蛋白質は、蛋白質分子中に少なくとも一個以上該糖が修飾されていればよく、使用目的に応じて種々選定できる。例えば、糖修飾蛋白質を生理活性物質として使用する場合は、一般的には、蛋白質分子中の第1級アミノ基の70%以下、好ましくは10～50%が該糖により修飾されることが望ましい。

【0012】第1級アミノ基としては、リジン残基のε

10

20

30

40

50

3

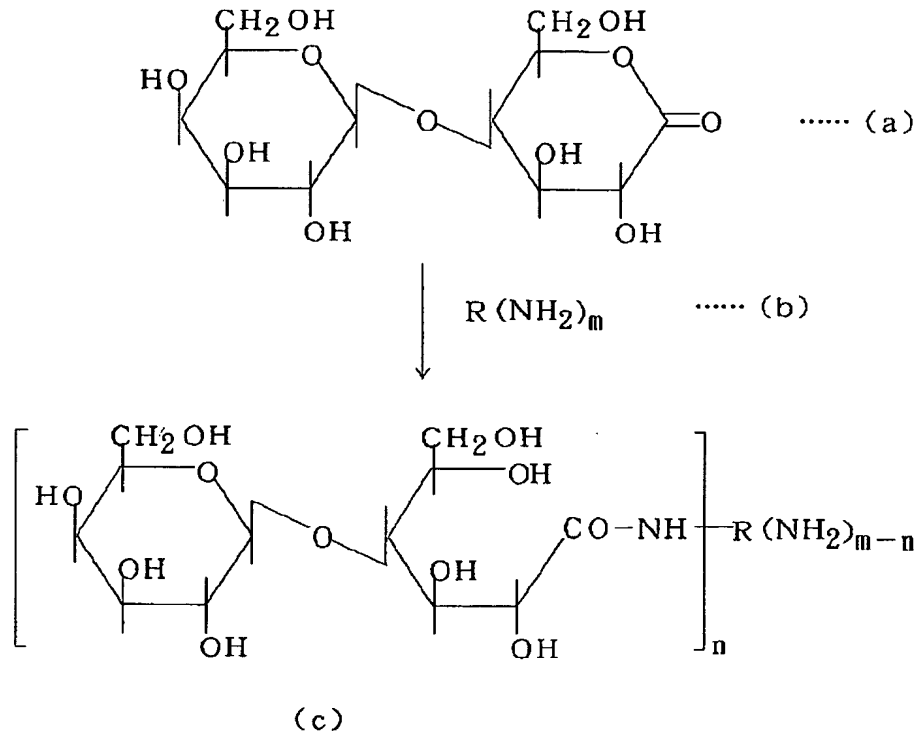
4

ーアミノ基または蛋白質N末端のアミノ基が挙げられる。例えば、ラクトースラクトンとこの第1級アミノ基を有した蛋白質とが、アミド結合反応のみにより糖修飾*

* 蛋白質を生成した場合の反応式は以下の通りである。

【0013】

【化1】



【0014】式中、(a)はラクトースラクトンの構造を、(b)は蛋白質の一般式を、(c)は生成した糖修飾蛋白質の一般式を示す。また、 m は、蛋白質の第1級アミノ基の数、 n はアミド結合数、 R は、蛋白質骨格、また $m \geq n$ である。 $100n/m$ は、糖修飾率を示す。本発明の糖修飾蛋白質の合成は、ラクトースラクトンと蛋白質の反応を水性溶媒中、 $0 \sim 45^\circ\text{C}$ で行うことが好ましい。反応溶媒としては、水または緩衝液（例、ほう酸塩緩衝液、りん酸塩緩衝液、りん酸緩衝生理食塩水等）の水性溶媒が使用される。反応温度は蛋白質が変性または失活しない温度であればよいが、通常約 $0 \sim 45^\circ\text{C}$ の範囲、特に室温付近が好ましい。反応の pH は約 $3 \sim 10$ の広い範囲でありうるが、中性付近が望ましい。反応時間は約 $0.5 \sim 100$ 時間程度、好ましくは $20 \sim 50$ 時間であればよい。反応に際して、ラクトースラクトンおよび蛋白質それぞれの使用量は、所望の糖修飾率により適宜選定されるが、蛋白質が生理活性物質の場合は、生成する糖修飾蛋白質の生理活性を指標として予備実験によって決定することができる。通常、生理活性蛋白質中の第1級アミノ基に対して約 $0.5 \sim 50$ 倍モルである。

【0015】上記反応後、反応液を透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、HPLC、電気泳動等通常の蛋白質の精製法で精製し、目的の糖修飾蛋白質の精製物を得ることができる。本発明の糖修飾蛋白質には、蛋白質にガラクトース残基が導入され

ているためガラクトースに親和性を持つ肝実質細胞の特性を利用して選択的にまた効率的に生理活性蛋白質を肝組織に到達させることが可能であり、肝癌、肝硬変、肝炎等の肝疾患の治療または予防に特に有効性を発揮する。さらに、本発明の糖修飾蛋白質は生体内での半減期も延長されており、持続性を有している。

【0016】本発明の糖修飾蛋白質を、通常自体公知の担体、希釈剤等を用いて適宜の医薬品組成物（例、注射剤、錠剤、カプセル剤）として非経口的または経口的にヒトを含む哺乳動物に投与することができる。例えば、本発明による糖修飾蛋白質の蛋白質としてスーパーオキシジスムターゼ（以下「SOD」と略す）を使用した糖修飾SODを抗炎症剤として用いるには、例えば注射剤、錠剤等の形態で、SODの量として約 $0.1 \sim 5 \text{ mg/kg}$ の投与量で患者に投与することができる。

【0017】その他、本発明の糖修飾蛋白質に使用できる蛋白質としては、ヒトを含む各種動物由来（細胞培養によるものを含む）のもの、微生物由来のもの、植物由来のもの、遺伝子工学産物、合成品のいずれでもよい。例えば、サイトカイン（例、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、インターロイキン2等）、ホルモン（例、成長ホルモン、インスリン）、酵素（例、アスパラギナーゼ、各種プロテアーゼ、各種ペプチダーゼ等）、免疫グロブリン、プロテアーゼインヒビター、各種チトクローム等が挙げられる。とりわけ好ましい生理

30

40

50

活性蛋白質としては、ヒトを含む各種動物由来、微生物由来、植物由来または遺伝子組換え技術で生産されたSOD（ヒトCu、Zn型-SOD、Mn型-SOD、Fe型-SOD等）等が挙げられる。

【0018】

【実施例】以下、本発明の具体的実施例を説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。なお、実施例において、ガラクトース糖鎖はヒドラジン分解法（統生化学実験講座、第4巻、142頁）により分析した。また、糖修飾率はTNBS（2,4,6-トリニトロベンゼン

スルホン酸）法（A. F. S. A. HABEED, Anal. Biochem., 14, 328(1966)）により測定した。

【0019】参考例：ラクトースラクトンの製造

（1）ラクタネートの製造

ラクトース26gを水450mlに溶解し、メタノール35mlを加え、さらにヨウ素37.45gを含むメタノール600mlを40℃で加え、次いで4%水酸化カリウム溶液（35.2g/875ml）を加えて40℃で60分反応させた。ヨウ素の色が消失したら氷冷し、メタノール1000mlを加え、沈澱を濾取し、冷メタノールとエーテルで洗浄し、水150mlに溶解してメタノールを添加し、沈澱を濾取してラクトースのグルコースが開環し、その1位がカルボキシル基のカリウム塩である化合物（ラクタネート）18gを得た。

（2）ラクトースラクトンの製造

表1

ロット	収量(mg)	糖修飾率(%)	活性 (単位/mg蛋白)	HPLC(分)
LL-SOD-1	4.8	18.2	2800	7.87
LL-SOD-2	4.9	36.4	1650	8.13
LL-SOD-3	5.0	54.5	1200	8.63
SOD		0	3000	6.42

【0023】（体内動態）ロットLL-SOD-3及びSODを[2,3-³H] スクシンイミジルプロピオネート（succinimidyl propionate）で標識し、2500kBq/mgの³H-LL-SOD-3及び2500kBq/mgの³H-SODを調製した。雄性C₃H/HeN 6週齢マウス尾静脈から10μg 蛋白質相当を投与し、投与※

表2

検体	投与後の時間 (min)	体内動態 (% ID/g)		
		血中	肝臓	腎臓
³ H-SOD	5	15.8	5.1	89.6
	15	6.9	2.3	102.1
	30	7.2	1.3	24.5
	60	3.6	1.1	17.2
³ H-LL-SOD-3	5	6.6	33.6	47.3
	15	4.4	20.4	50.4
	30	2.8	13.6	23.3
	60	1.2	5.4	10.4

【0025】

【発明の効果】本発明の糖修飾蛋白質は、未修飾の蛋白

*（1）で製造したラクタネート10gを水200mlに溶解し、ダウエックス（Dowex）50（H⁺）カラムに通過させて、遊離型とし、これを濃縮し、メタノールを加えて濃縮した。メタノールを溜去し、生成した沈澱にエタノールを加え、沈澱を濾取してラクトースラクトンを得た。

【0020】実施例1：SODのラクトースラクトンによる修飾

（製造）牛の赤血球由来のSOD（分子量32000；アミノ基22個；3000 units/mg 蛋白質）5mg（0.156μmol；第1級アミノ基として3.44μmol）を水1mlに溶解し、ラクトースラクトンを6mg（16.76μmol）、15mg（41.9μmol）および30mg（83.8μmol）ずつ加えて室温で48時間反応した。反応液を水に対して透析し、凍結乾燥した。

【0021】それぞれ上記ラクトースラクトンの使用量の順番に生成した糖修飾SODの各ロットをLL-SOD-1、2および3とした。収量、糖修飾率（糖で修飾された第1級アミノ基の個数はそれぞれ4個、8個及び12個）、活性、イオン交換樹脂を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（DEAE 5PW）による溶出時間を表1に、アセチルセルロース電気泳動（溶媒：0.1M ピリジン/ギ酸（pH3.0）、泳動：30分（0.5mA/cm）、クーマシーブルー染色）を図1に示した。

【0022】

【表1】

※後経時的に動物を屠殺し、血液及び各臓器の放射活性を測定して体内動態を調べた。その結果を表2に示した。

【0024】

【表2】

質に比べて肝臓への集積性が極めて高く、生体内での半減期が延長されている。このため、肝癌、肝硬変、肝炎

等の肝疾患の治療または予防に該蛋白質を使用すると、未修飾の蛋白質を使用した場合に比べて極めて高い治療効果または予防効果をあげることができる。

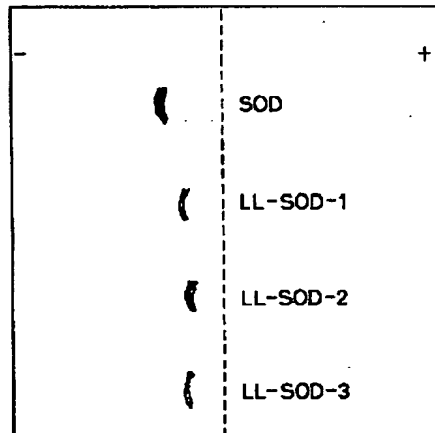
【0026】本発明の糖修飾蛋白質の製造法は、蛋白質が過酷な反応条件に晒されないために、化学的修飾による生理活性の低下を防ぐことができ、高い生理活性を有する糖修飾蛋白質を得ることができる極めて優れた方法*

*である。また、本発明は、種々の機能を有する蛋白質を種々の糖修飾率の糖修飾蛋白質とすることができるので、目的に応じて種々の機能性蛋白質を製造できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による糖修飾SODと未処理のSODのアセチルセルロース電気泳動による泳動図を示すものである。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

A 6 1 K 38/44

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所